

Comparison of the molecular effects of abamectin and ivermectin on structural changes in bovine serum albumin protein using spectroscopic and molecular docking methods

Asma Valizadeh¹, Parvaneh Maghami^{*1}, Leila Hassani², Sohrab Imani³

1- Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan 45137-66731, Iran.

3- Department of Entomology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Pesticides are among the most important environmental factors that have been widely produced and used in recent years and they have undeniable effects on the environment and human health. The newly developed pesticides known as Avermectins, which includes Abamectin and Ivermectin, are effective against parasites. In this study, we compare the molecular effects of Abamectin and Ivermectin's interaction on the structural changes of bovine serum albumin (BSA).

Materials and Methods: In this study, the interaction effects of bovine serum albumin (BSA) with two compounds, Abamectin (pesticide) and Ivermectin (antiparasitic drugs), were investigated using different methods of visible-ultraviolet spectroscopy, intrinsic fluorescence at different urea concentrations, and Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) along with molecular modeling and thermal accumulation studies.

Results: The results of UV-Visible spectroscopy showed that increasing the concentration of ligands (Abamectin and Ivermectin) caused a decrease in the absorption intensity at a wavelength of 280 nm (hypochromic effect), indicating the occurrence of interactions between the ligands and bovine serum albumin (BSA). The study of the changes in the binding free energy (ΔG) confirmed that these interactions are spontaneous. Fluorescence spectroscopy analysis of the urea effect revealed that the emission intensity of the protein decreased more significantly in the presence of Abamectin compared to Ivermectin, indicating a change in the polarity of the microenvironment surrounding aromatic amino acid residues such as tryptophan. The results of Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) also showed that the content of the secondary structure of the bovine serum albumin protein in the presence of ligands has slight changes. Abamectin's binding to BSA was more stable than Ivermectin's, as the binding energy value of Abamectin (-11.9 kcal/mol) is lower than that of Ivermectin (-11.0 kcal/mol). The protein aggregation results indicated that BSA is highly prone to aggregate in the presence of any ligand. Comparison of the molecular effects of these two ligands in the interaction with BSA showed that the structural changes of the protein in the interaction with Abamectin are greater than those of Ivermectin, which could be due to the difference in the type of functional groups and chemical structure of the ligands.

Conclusion: This study, using spectroscopic and molecular modeling techniques, showed that Abamectin has greater molecular effects than Ivermectin in changing the structure of BSA. Because of the distinctions in the type of interaction and the chemical composition and functional groups of these ligands.

Keywords: Bovine Serum Albumin, Abamectin, Ivermectin.

***Corresponding author:**

Parvaneh Maghami; Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran;

Email: maghami243@iaiu.ir

مقایسه اثرهای مولکولی آبامکتین و ایورمکتین در تغییرهای ساختاری پروتئین آلبومین سرم گاوی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و داکینگ مولکولی

اسما ولی زاده^۱، پروانه مقامی^{۱*}، لیلا حسنی^۲، سهراب ایمانی^۳

- ۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان، ایران.
- ۳- گروه حشره‌شناسی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آفت‌کش‌ها از مهم‌ترین عوامل محیطی هستند که در سالیان اخیر به‌طور گسترده تولید و استفاده می‌شوند و اثرهای انکارناپذیری بر محیط‌زیست و سلامت انسان بر جای می‌گذارند. آبرمکتین‌ها آفت‌کش‌های جدیدی هستند که نمونه‌هایی از آن شامل آفت‌کش آبامکتین و داروی ضدانگل ایورمکتین می‌باشد. در تحقیق حاضر اثرهای مولکولی برهم‌کنش آبامکتین و ایورمکتین بر تغییرهای ساختاری پروتئین سرم گاوی به‌طور مقایسه‌ای موردبررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اثر برهم‌کنش آلبومین سرم گاوی (BSA) با دو ترکیب آبامکتین (آفت‌کش) و ایورمکتین (داروهای ضدانگل) با روش‌های مختلف طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش، فلورسانس ذاتی در غلظت‌های مختلف اوره و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (ATR-FTIR) همراه با مدل‌سازی مولکولی و مطالعه‌های تجمع گرمایی موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج طیف سنجی مرئی-فرابنفش نشان داد که افزایش غلظت لیگاندها (آبامکتین و ایورمکتین) باعث کاهش شدت جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (اثر هیپوکرومیک) شده است که نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس بین لیگاندها با BSA می‌باشد. بررسی تغییرهای انرژی آزاد اتصال (ΔG) تأیید کرد که این برهم‌کنش‌ها خودبه‌خودی هستند. بررسی اثر اوره با روش طیف‌سنجی فلورسانس نیز نشان دادند که شدت نشر پروتئین در حضور آبامکتین نسبت به ایورمکتین کاهش بیشتری داشت که نشان‌دهنده تغییر قطبیت محیط اطراف باقی‌مانده‌های اسیدآمینه‌های آروماتیک مانند تریپتوفان است. همچنین نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (ATR-FTIR) نشان داد که محتوای ساختار دوم پروتئین BSA در حضور لیگاندها تغییرهای جزئی دارد. نتایج حاصل از تحلیل داکینگ مولکولی نشان داد که آبامکتین اتصال پایدارتری به پروتئین دارد، زیرا مقدار انرژی اتصال آن (۱۱/۹- کیلوکالری بر مول) کمتر از ایورمکتین (۱۱/۰- کیلوکالری بر مول) است. نتایج تجمع پروتئین نشان داد که BSA تمایل بالایی به تجمع در حضور هر دو لیگاند دارد. مقایسه اثرهای مولکولی این دو لیگاند نشان دادند که تغییرهای ساختاری پروتئین در برهم‌کنش با آبامکتین نسبت به ایورمکتین بیشتر است که می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع گروه‌های عاملی و ساختار شیمیایی لیگاندها باشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی و مدل‌سازی مولکولی نشان دادند که اثرهای مولکولی آبامکتین نسبت به ایورمکتین در تغییر ساختار BSA بیشتر است به‌دلیل تفاوت نوع برهم‌کنش و تفاوت در ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی در این لیگاندها می‌باشد.

واژگان کلیدی: پروتئین آلبومین سرم گاوی، آبامکتین، ایورمکتین.

نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه

آزاد اسلامی، تهران، ایران.

- پست الکترونیکی: maghami243@iau.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱

۱- مقدمه

آفت‌کش‌ها از مهم‌ترین عوامل محیطی هستند که در سالیان اخیر به‌طور گسترده تولید و استفاده می‌شوند و اثرهای انکارناپذیری بر محیط‌زیست و سلامت انسان برجای می‌گذارند (1). مواجهه انسان چه به‌صورت عمدی یا تصادفی اثرهای زیستی مخربی دارد به‌طوری‌که هیچ ماده آفت‌کشی کاملاً مطمئن و بی‌خطر برای سلامت و زندگی انسان‌ها وجود ندارد (2). بقایای آفت‌کش‌ها خاک و آب را آلوده می‌کند، در محصولات باقی می‌ماند، وارد زنجیره غذایی می‌شود و در نهایت از طریق موادغذایی و آب وارد بدن انسان می‌شود (3). استفاده گسترده از سموم کشاورزی از جمله آفت‌کش‌ها، منجر به نفوذ آن‌ها در جریان خون انسان و برهم‌کنش آن‌ها با پروتئین‌های پلاسما مانند پروتئین آلبومین سرم انسانی می‌شوند و بر عملکرد بیولوژیکی آن‌ها تأثیر می‌گذارند (4).

آورمکتین‌ها آفت‌کش‌های جدیدی هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ از باکتری استرپتومایسس آورمیتیلیس^۱ گونه اکتینومایسس^۲ جدا شدند (5,6). نمونه‌هایی از آورمکتین‌ها عبارتند از آبامکتین ($C_{95}H_{142}O_{28}$) و ایورمکتین ($C_{48}H_{74}O_{14}$) هستند (7). آبامکتین که به‌نام (آورمکتین B1) نیز شناخته می‌شود برای تنظیم جمعیت حشرات مانند کنه‌ها و سوسک‌ها استفاده می‌شوند (8). آبامکتین محصول تخمیر طبیعی باکتری استرپتومایسس آورمیتیلیس خاک است که علاوه بر این، آبامکتین ترکیبی از آورمکتین‌های B1_a و B1_b است که حاوی حداقل ۸۰ درصد آورمکتین B1_a و ۲۰ درصد آورمکتین B1_b است؛ این دو جز خواص زیستی و سم‌شناسی بسیار مشابهی دارند (9). آبامکتین نه تنها برای کنترل آفات حشرات و کنه مرکبات استفاده می‌شود بلکه برای محصولات از جمله گلابی، آجیل، سبزیجات برگ‌دار، سبزیجات میوه‌دار، آلو، آووکادو، نعنای و ریحان نیز استفاده می‌شوند (8). ایورمکتین رایج‌ترین مشتق آورمکتین است، مخلوطی از اجزای B1_a و B1_b در نسبت ۲۰:۸۰ می‌باشد (10). این ترکیب آنالوگ آبامکتین بوده و در انسان نیز کاربرد دارد. همچنین از شناخته‌شده‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای ضدانگلی در پزشکی و دام‌پزشکی

است (11). در ایالات متحده و سایر کشورها توسط انسان برای درمان عفونت دستگاه گوارش و درمان فیلاریازیس لنفاوی^۳ استفاده می‌شود (10). همچنین داروی ضدانگلی به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای کرونا موردتوجه ویژه قرار گرفته است و در حیوانات برای درمان انگل و به‌عنوان میکروفیلا رگش استفاده می‌شود (12). آبامکتین (ivermectin B1) و ایورمکتین از اعضای خانواده داروهای ضدکرم لاکتون ماکروسیکلیک^۴ مشتق شده از باکتری استرپتومایسس آورمیتیلیس هستند. آبامکتین پیش‌ساز ایورمکتین است و تفاوت آن با ایورمکتین در داشتن یک پیوند دوگانه در موقعیت C22-23 است (13).

در مطالعه‌های پیشین اثر آفت‌کش ایمیداکلوپرید بر روی آلبومین سرم انسانی (HSA) با استفاده از طیف‌سنجی جذب فلورسانس و طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی بررسی شد. نتایج اثر آفت‌کش ایمیداکلوپرید بر ساختار HSA با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس هم‌زمان CD^۵ و طیف‌های فلورسانس سه‌بعدی تجزیه و تحلیل نشان دادند که این آفت‌کش محیط اطراف باقی‌مانده‌های تریپتوفان و تیروزین را تغییر داده است (14). همچنین در پژوهش دیگری نحوه برهم‌کنش دیازینون (یک سم ارگانوفسفاته) با آلبومین سرم انسانی (HSA) با روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی ماوراءبنفش مرئی، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) و داکینگ مولکولی مطالعه گردید. نتایج نشان می‌دهند که افزایش غلظت دیازینون باعث کاهش شدت فلورسانس HSA می‌شود که نشان‌دهنده تشکیل کمپلکس بین دیازینون و HSA است و در غلظت‌های بالا، دیازینون ممکن است باعث باز شدن جزیی ساختار HSA و کاهش عملکرد آن شود (15). مطالعه‌های دیگر نیز نشان دادند که حضور آفت‌کش‌ها در جریان خون بدن انسان می‌توانند روی HSA پروتئین مهم پلاسما در کنار کاهش غلظت آزاد آن، تغییرهای ساختاری هرچند به‌صورت جزیی متناسب با زمان حضور در بدن اعمال کنند و با تغییر کنفورماسیون ساختار دوم و سوم پروتئین HSA عملکرد بیولوژیکی آن اختلال ایجاد کنند (16).

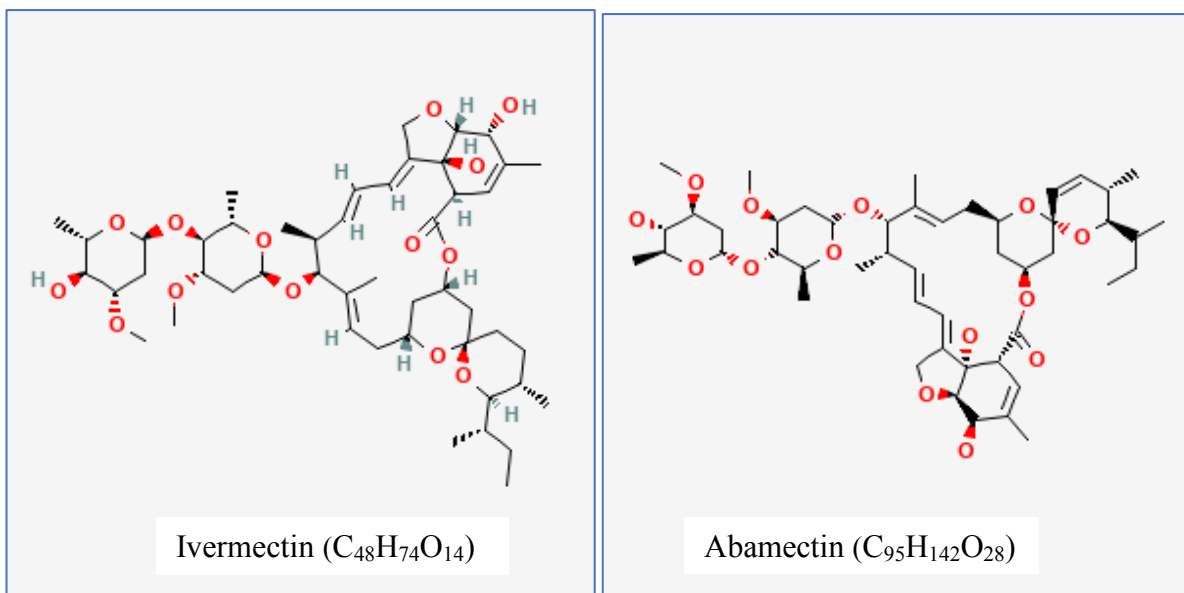
³ Lymphatic Filariasis

⁴ Macrocyclic Lactone

⁵ Circular Dichroism Spectrometer

¹ *Streptomyces avermitilis*

² Actinomycetes



شکل ۱- ساختار شیمیایی آبامکتین و ایورمکتین

را تغییر داده و ممکن است عوارض جانبی ناشی از تمایل قوی به BSA یا آلبومین سرم ایجاد کند. از این رو، اتصال بهینه داروها/لیگاندها به BSA، باعث اثربخشی درمانی بهینه در پژوهش‌ها گردد (23). هدف از این تحقیق بررسی تغییرهای ساختاری پروتئین سرم گاوی (BSA) در برهم‌کنش با آفت‌کش آبامکتین و داروی ایورمکتین و مقایسه اثرهای مولکولی آن‌ها می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

آبامکتین، ایورمکتین، پروتئین سرم گاوی (BSA)، DTT (۱۰۴-دی تیوتریتول) همگی از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شدند. نمونه‌ها در بافر ۱۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH ۷/۴) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شدند. تمامی محلول‌ها به‌صورت تازه و با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت BSA (۱۰ ماکرومولار) در بافر فسفات (۱۰^{-۳}×۱۰ مولار) با قانون Beer-Lambert تعیین شد؛ ضریب خاموشی (g mol⁻¹) ۴۴۰۰۰ MW در ۲۸۰ نانومتر. محلول استوک اولیه آبامکتین و ایورمکتین با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در بافر فسفات (۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد.

۲-۱- ارزیابی طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش

طیف‌سنجی ماوراء بنفش-مرئی برای تشخیص تغییرهای ساختاری ناشی از اتصال لیگاند به پروتئین استفاده گردید. جهت تعیین غلظت پروتئین و بررسی تغییرهای ساختار پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف آبامکتین و

فراوان‌ترین پروتئین خون، آلبومین سرم^۱ است که با فشار انکوتیک پلاسما، حجم مایع خارج‌سلولی را تثبیت می‌کند (17). همچنین، به‌عنوان یک پروتئین حامل (مواد خارجی و داخلی) که با طیف وسیعی از داروهای مختلف و لیگاندها برهم‌کنش دارد و می‌تواند موجب تغییر در خواص فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک آن‌ها شود (18). آلبومین سرم انسان (HSA) و آلبومین سرم گاوی (BSA) از جمله پروتئین‌های مورد مطالعه هستند و اغلب در مطالعه‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (19). BSA همولوگ HSA است که در فارماکوکینتیک برای میل دارو به‌عنوان جایگزین HSA استفاده می‌شود چراکه از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه می‌باشد (20). BSA دارای وزن مولکولی ۶۶/۴ کیلودالتون است و شامل ۱۷ پیوند دی‌سولفیدی و یک باقی‌مانده سیستئین آزاد است. زیردانه‌های BSA شامل IA (آمینواسیدهای ۶-۱۰۵)، IB (آمینواسیدهای ۱۱۹-۱۹۶)، IIA (آمینواسیدهای ۱۹۷-۲۹۱)، IIIB (آمینواسیدهای ۳۱۴-۴۸۱)، IIIA (آمینواسیدهای ۵۱۱-۵۸۳) می‌باشد (21). ۵۱۰ و IIIB دارای باقی‌مانده Trp 134 و زیردانه IIA دارای باقی‌مانده Trp 212 است (22). تمایل داروها/لیگاندها به BSA خواص آن‌ها مانند جذب، انتقال، متابولیسم، دفع و افزایش نیمه‌عمر بیولوژیکی دارو/لیگاند

¹ Serum Albumin

ایورمکتین از دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش (T90 + PG INSTRUMENTS انگلستان) ارزیابی شد. آزمایش تجمع BSA با غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین با افزودن محلول دی‌تیوتریتول^۱ (۰/۱ مولار) جهت شکستن باندهای دی‌سولفیدی تا رسیدن به غلظت نهایی ۶/۰ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه انجام گردید.

۵-۲- داکینگ مولکولی (Molecular Docking)

اتصال لیگاند با پروتئین BSA، که از بانک اطلاعات پروتئین (RCSB) با کد PDB ID 4F5S استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه به‌منظور پیش‌بینی محل‌های اتصال احتمالی در BSA با روش داکینگ مولکولی انجام شد. در این راستا، از نرم‌افزار Auto-dock نسخه ۴/۲ برای بررسی اتصال ساختارهای بهینه‌شده لیگاند به پروتئین استفاده شده است. سایت <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> به‌عنوان منبع ساختار سه‌بعدی لیگاندها مورد استفاده قرار گرفت. پس از انتخاب زنجیره موردنظر از BSA، تغییرهای لازم شامل حذف مولکول‌های آب و افزودن اتم‌های هیدروژن به ساختار BSA اعمال شد. اتصال لیگاندها به BSA توسط نظریه^۲ LGA بررسی شد. همچنین، برای افزایش سطح اتصال لیگاند در تمام جهات BSA، اندازه شبکه (A126 × 96 Å × 102 Å) و فاصله نقطه شبکه (۰/۶ آنگستروم) تنظیم شد. محاسبه‌ای داکینگ ترکیب انتخابی را با حداقل انرژی آزاد اتصال هدر رفته پس از حداکثر ۵۰۰ حالت اتصال نشان داد. برهم‌کنش لیگاند و BSA با استفاده از نرم‌افزار Lig-Plot⁺ (نسخه ۱/۴) برای تحلیل نیروهای اتصال ارزیابی شد.

۳- نتایج

۳-۱- مطالعه‌های طیف‌سنجی ماوراء بنفش-مرئی (Uv-Vis)

از این تکنیک برای بررسی تغییرها در ساختار پروتئین سرم گاوی و همچنین بررسی برهم‌کنش آن با غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین (۱/۰، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) استفاده شد. نمودار شماره ۱، به‌ترتیب در بخش‌های (الف و ب)، تغییر بیشتر میزان جذب پروتئین

ایورمکتین از دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش (T90 + PG INSTRUMENTS انگلستان) استفاده شد. غلظت محلول BSA استوک در طول موج ۲۸۰ نانومتر از طریق قانون بیرلامبرت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. محلول پروتئینی استوک در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار و pH برابر ۷/۲ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. تغییرهای جذب در حضور غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) اندازه‌گیری شد (کلیه نتایج ۳ بار تکرار شدند).

۲-۲- طیف‌سنجی فلورسانس ذاتی

از روش طیف‌سنجی فلورسانس برای بررسی تغییرهای ساختار فضایی BSA استفاده شد. طیف‌ها با دستگاه (Varian Perkin-Elmer استرالیا) ثبت شدند. پهنای باند تحریک و نشر ۵ نانومتر بود. هموارسازی طیف‌ها به حدی انجام شد که تغییری در شکل طیف ایجاد نشود. طول سل برابر با یک سانتی‌متر می‌باشد. برای بررسی برهم‌کنش آبامکتین و ایورمکتین (۲۰ میکرومولار) با ساختار سرم آلبومین گاوی، ابتدا طیف نشری پروتئین ثبت شده، سپس هرکدام از ترکیب‌ها به محلول پروتئین اضافه گردیدند و پس از ۲ دقیقه طیف‌ها ثبت شدند. غلظت سرم آلبومین گاوی ۱۰ میکرومولار، نشر در ۳۴۰ نانومتر پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف اوره (۰ تا ۵/۵) بررسی گردید.

۳-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (ATR-FTIR)

طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه مجهز به لوازم جانبی بازتاب کلی ضعیف (ATR)، برای شناسایی ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه با مشخصات ابزار Thermo Fisher Scientific کشور ایالات متحده آمریکا به‌کار گرفته شد. طیف FT-IR در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ از پروتئین BSA در برهم‌کنش با آبامکتین و ایورمکتین در غلظت‌های مختلف (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) ثبت شد. نمونه‌ها در بافر فسفات pH ۷/۴ = و دما و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شدند.

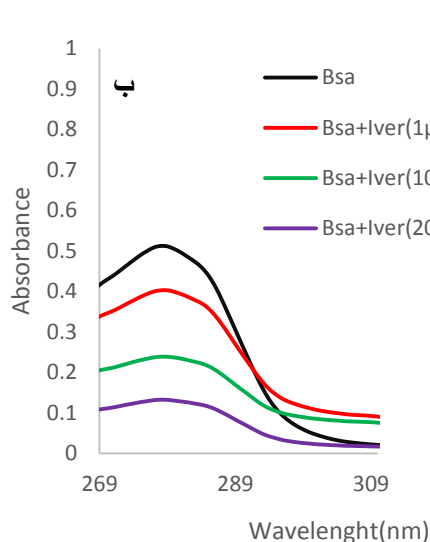
۴-۲- مطالعه‌های تجمع گرمایی

تست تجمع BSA بر اساس میزان جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش

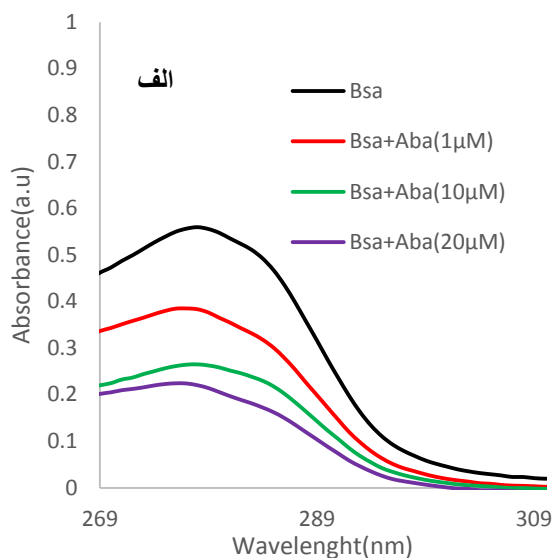
¹ DTT

² Lamarck's Genetic Algorithm

$(\pi \rightarrow \pi^*)$ در اسیدآمینه‌های آروماتیک مانند تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین است. کاهش شدت جذب در هر دو نمودار بیانگر این نکته است که آفت‌گش آباکتین و داروی ایورمکتین با پروتئین سرم گاوی برهم‌کنش داشته است. همچنین، با افزایش غلظت لیگاندها یک جابه‌جایی هیپوکرومیک جزئی در طیف جذب پروتئین مشاهده شد.



را در حضور غلظت‌های مختلف از آفت‌گش آباکتین و داروی ایورمکتین در غلظت‌های (۱/۰، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار ۱ (بخش‌های الف و ب) مشاهده می‌شود شدت جذب با افزایش غلظت لیگاند (آباکتین، ایورمکتین) در طول موج ۲۸۰ نانومتر کاهش یافته است. این کاهش به دلیل انتقال



نمودار ۱- (الف) طیف جذبی برهم‌کنش پروتئین (۱۰ میکرومولار) با آباکتین و (ب) طیف جذبی برهم‌کنش پروتئین (۱۰ میکرومولار) با ایورمکتین در غلظت‌های (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) به ترتیب پس از ۳ بار تکرار نشان می‌دهد.

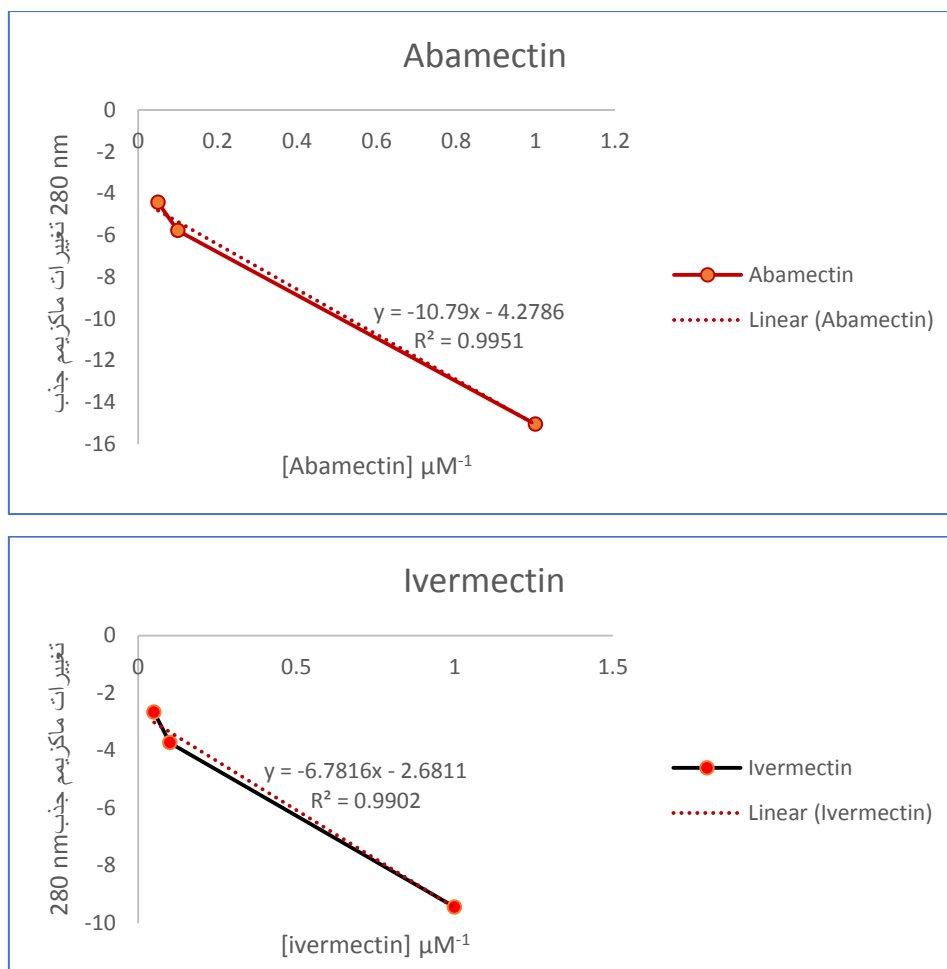
رسم گردید. همان‌طور که نتایج جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که شیب تغییرها در آباکتین نسبت به ایورمکتین بیشتر می‌باشد.

۲-۳- بررسی شیب تغییرهای جذب در طیف‌سنجی ماوراء بنفش-مرئی (Uv-Vis)

جهت مقایسه کمی تغییرهای جذب در برهم‌کنش آباکتین و ایورمکتین، نمودار خطی تغییرهای ماکزیمم جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر نسبت به غلظت‌های مختلف آباکتین و ایورمکتین (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار)

جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی از مقادیر رگرسیون پروتئین-آباکتین و پروتئین-ایورمکتین.

شیب	عرض از مبدا	نمونه‌ها
-۱۰/۷۹	-۴/۲۷	پروتئین-آباکتین
-۶/۷۸۱۶	-۲/۶۸۱۱	پروتئین-ایورمکتین

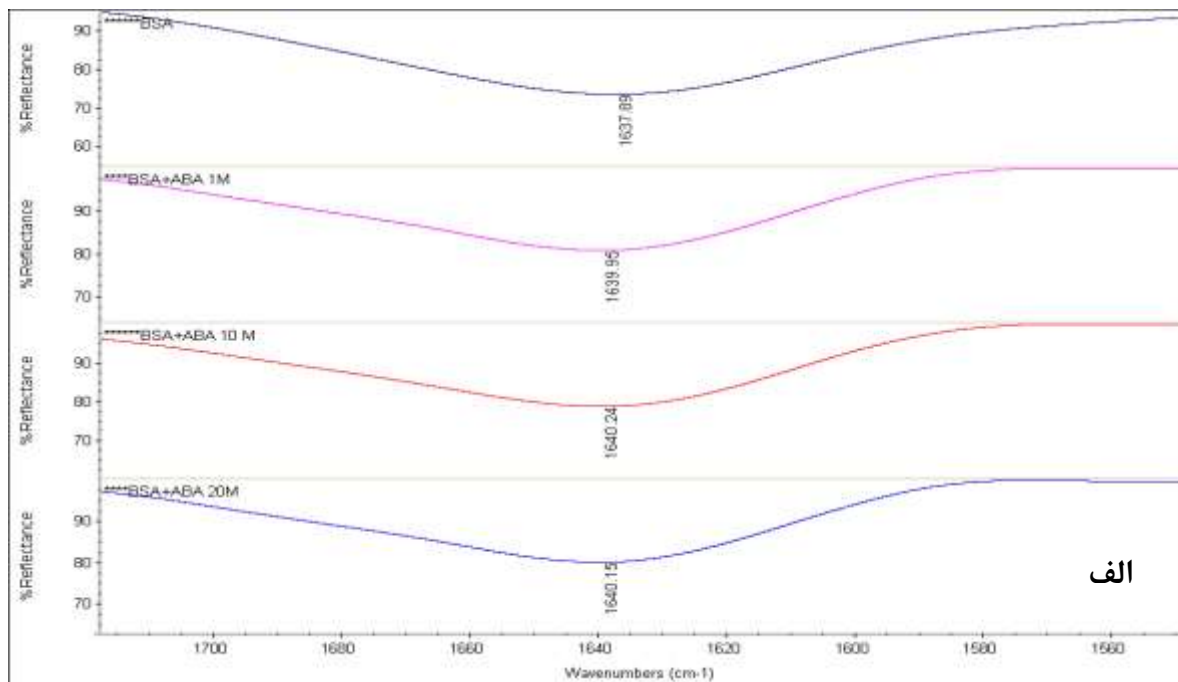


نمودار ۲- بنسی- هیلبراند برای تعیین ثابت اتصال شامل (الف) برهم‌کنش پروتئین-آبامکتین و (ب) برهم‌کنش پروتئین-ایورمکتین.

بخش‌های (الف و ب) طیف پیوند آمید I پروتئین در غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) نشان می‌دهد. براساس نمودار شماره ۳ هیچ‌گونه جابه‌جایی در عدد موج طیف‌های نواحی $(1600-1700\text{ cm}^{-1})$ پروتئین در غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین مشاهده نشد و تنها کاهش جزئی در شدت موج ثبت گردید. این نتایج نشان‌دهنده تغییرهای جزئی در محتوای ساختار دوم پروتئین BSA در حضور آبامکتین و ایورمکتین می‌باشد.

۳-۴- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (ATR-FTIR)

تغییرهای ساختار دوم در پروتئین‌ها در این مطالعه با استفاده از طیف‌سنجی ATR-FTIR بررسی گردید. باند آمید I ساختار BSA در محدوده $(1600-1700\text{ cm}^{-1})$ حساسیت بیشتری نسبت به باند آمید II نشان داد. تجزیه و تحلیل تغییرهای ساختار دوم پروتئین برای نمونه‌ها شامل BSA، BSA + آبامکتین و BSA + ایورمکتین انجام شد. نمودار شماره ۳ به ترتیب در

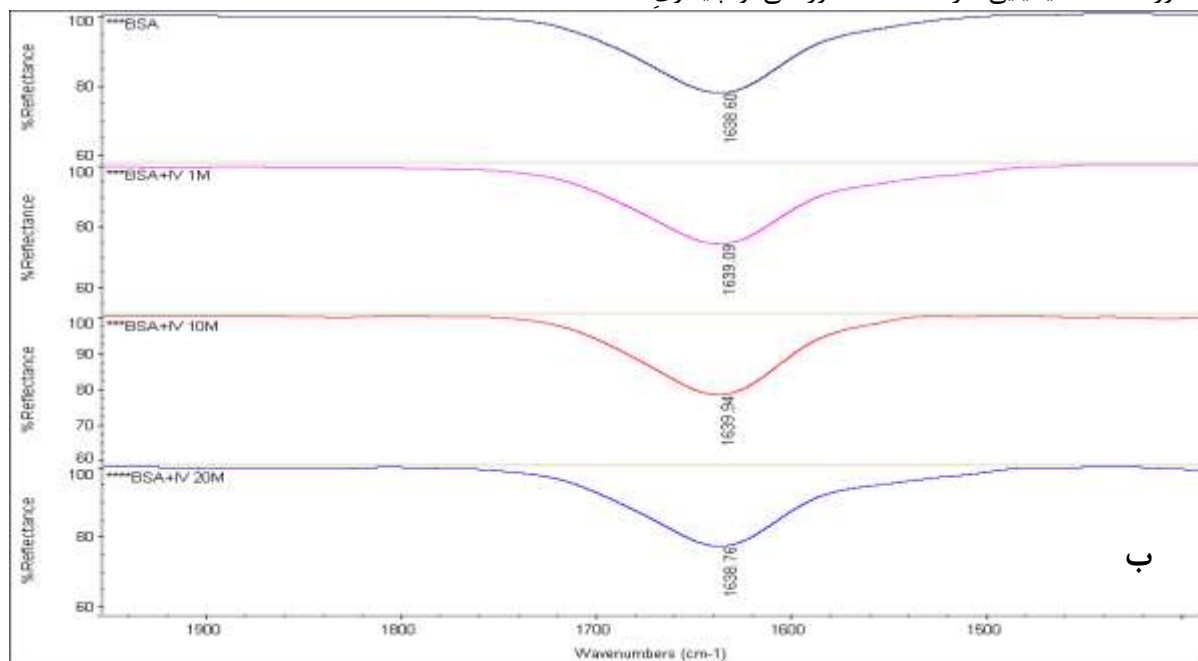


نمودار ۳- شکل (الف): طیف فروسرخ تبدیل فوریه پروتئین BSA (۱۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف آبامکتین و شکل (ب): طیف فروسرخ تبدیل فوریه پروتئین BSA در حضور غلظت‌های مختلف ایورمکتین پس از ۳ بار تکرار است.

پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این بررسی، درک مکانیسم‌های تاخوردگی و پایداری پروتئین در حضور عوامل دناتوره‌کننده است (24).

۳-۵- بررسی طیف‌سنجی فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف اوره

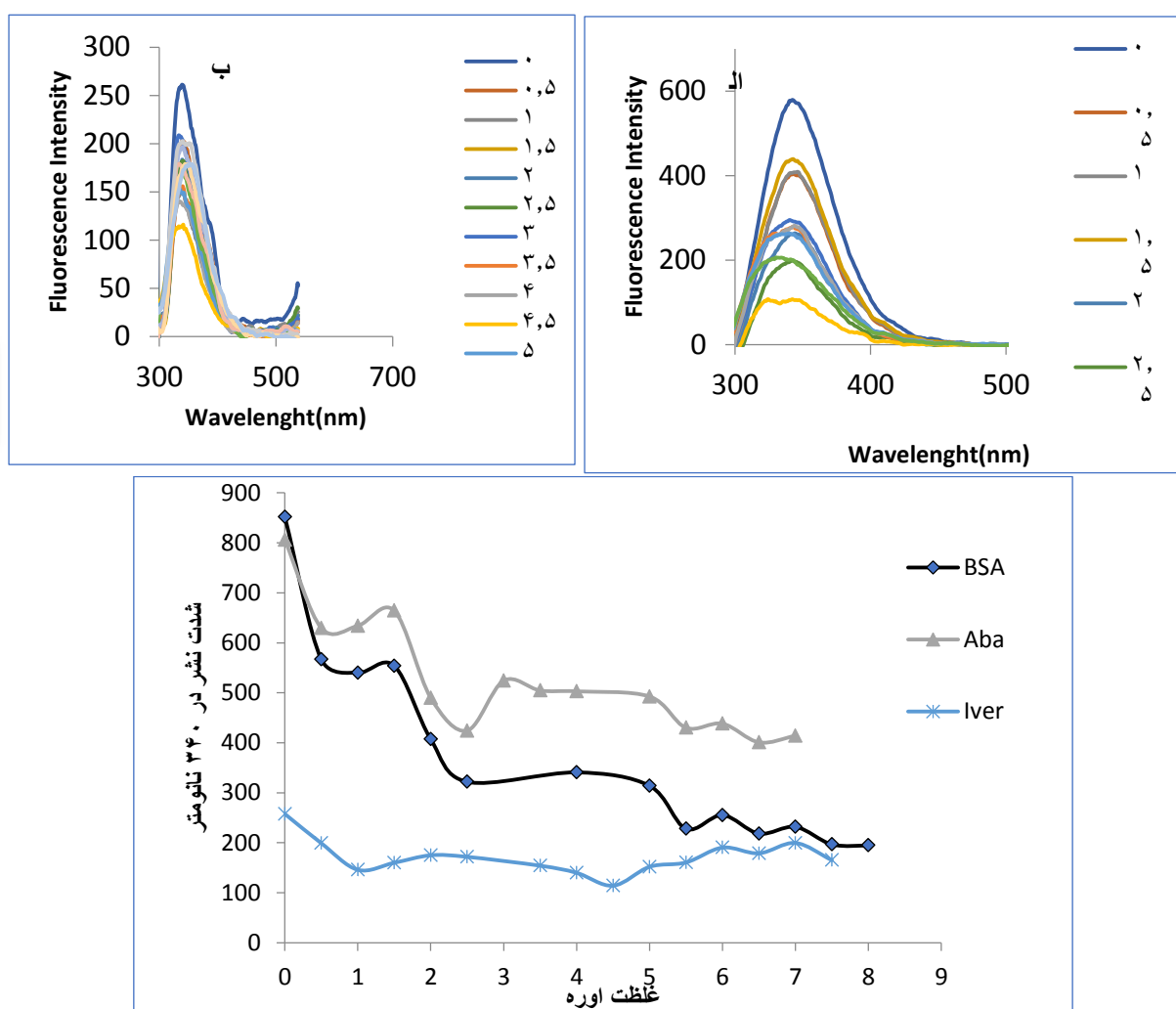
اوره و گوانیدینیم هیدروکلراید (GdmCl) به‌عنوان عوامل دناتوره‌کننده شیمیایی در مطالعه تاخوردگی و پایداری



نمودار ۴- طیف نشری آلبومین سرم گاوی، به‌ترتیب در بخش (الف) در حضور آبامکتین (۲۰ میکرومولار) و در بخش (ب) در حضور ایورمکتین (۲۰ میکرومولار) در غلظت‌های صفر تا ۵/۵ مولار اوره با طول موج تحریکی ۳۴۰ نانومتر است.

در نمودار شماره ۴ (الف و ب)، به ترتیب برهم‌کنش آلبومین سرم گاوی با آبامکتین و ایورمکتین (غلظت بررسی شده برای هر دو لیگاند ۲۰ میکرومولار است) در غلظت‌های صفر تا ۵/۵ مولار اوره در طول موج تحریکی ۳۴۰ نانومتر نشان داده شده است. کاهش شدت نشر و جابه‌جایی طیف‌ها به سمت طول موج کوتاه‌تر، نشان‌دهنده تغییر قطبیت محیط اطراف باقی‌مانده اسید آمینه تریپتوفان است. نمودار شماره ۵ میزان تغییرهای بیشینه شدت نشر در حضور دو ترکیب آبامکتین و ایورمکتین را نشان می‌دهد. در این نمودار تغییرهای شدت نشر در طول موج بیشینه نشر (۳۴۰ نانومتر) در غلظت‌های مختلف

اوره مشاهده می‌شود (در این بررسی، نشر آبامکتین و ایورمکتین در طول موج ۳۴۰ نانومتر از تمامی نمونه‌ها کسر گردید). نمونه‌ها شامل آلبومین سرم گاوی، آلبومین سرم گاوی + آبامکتین، آلبومین سرم گاوی + ایورمکتین هستند. همان‌طور که در نمودار شماره ۵ مشخص است، روند تغییرهای شدت نشر در حضور دو ترکیب آبامکتین و ایورمکتین کاهش می‌یابد. همچنین، همان‌طور که نشان داده شده است روند کاهش شدت نشر در حضور آبامکتین بیشتر از ایورمکتین است. تغییرهای شدت نشر در غلظت‌های مختلف اوره بیانگر دیناتوراسیون شیمیایی پروتئین در برهم‌کنش با آبامکتین و ایورمکتین است.



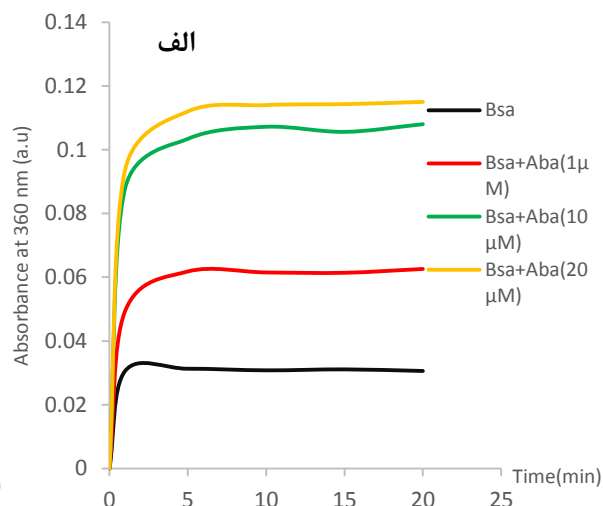
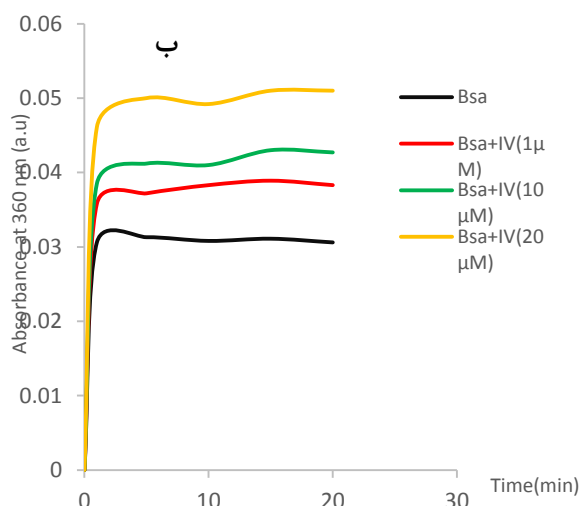
نمودار ۵- تغییرهای شدت نشر در طول موج بیشینه نشر در غلظت‌های مختلف اوره در سه نمونه مشاهده می‌شود. طول موج تحریک ۳۴۰ نانومتر است.

۳-۶- مطالعه‌های تجمع گرمایی

به منظور ارزیابی اثر آبامکتین و ایورمکتین بر پایداری حرارتی و تجمع پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA)،

آزمایش تجمع حرارتی وابسته به زمان در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در غلظت‌های مختلف آبامکتین و ایورمکتین انجام شد. در این آزمایش، میزان جذب پروتئین در دمای

میلی مولار و pH برابر ۷/۲ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تهیه شدند). طبق نمودار شماره ۶، تجمع پروتئین (الف) در حضور آلامکتین و (ب) در حضور ایورمکتین نشان داده شده است. همان طور که در هر دو نمودار مشاهده می شود، اثر تجمع پروتئین از طریق شیب تغییرهای جذب در ۳۶۰ نانومتر در زمان های مختلف قابل مشاهده است. طبق نتایج، اثر تجمعی آلامکتین در پروتئین، بیشتر از ایورمکتین است.



نمودار ۶- ارزیابی تجمع BSA (۱۰ میکرومولار) بخش (الف): در حضور آلامکتین غلظت های (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) بخش (ب): و در حضور ایورمکتین با غلظت مشابه، پس از ۳ بار تکرار نشان داده شده است.

۱۰/۱، -۱۰/۰، -۹/۷ و -۹/۶- کیلوکالری بر مول است. این نتایج نشان می دهند که لیگاند به طور خودبه خود و پایدار به پروتئین در بهترین حالت (۱۱/۹- کیلوکالری بر مول) متصل شده است و این حالت برای تحلیل بیشتر و بررسی برهم کنش های مولکولی انتخاب شده است. برهم کنش خوشه ای ذکر شده از پیوند مولکولی پروتئین-آلامکتین با استفاده از نرم افزار ligplot تحلیل شد و نشان داد که آلامکتین و اسیدهای آمینه موجود در BSA پیوندهای هیدروفوبیک تشکیل داده اند. پیوند هیدروژنی با Ser-428 از BSA توسط گروه هیدروکسیل (C25) آلامکتین ایجاد شده است. علاوه بر این شکل ۲ (الف) نشان می دهد که فاصله بین اتم های آلامکتین و پروتئین معمولاً کمتر از ۳ آنگستروم است که بیانگر اتصال قوی و پایداری کمپلکس می باشد. فاصله کم بین اتم های آلامکتین و باقی مانده های آمینواسیدی نشان دهنده اتصال قوی است که می تواند بر فعالیت بیولوژیکی پروتئین تأثیر بگذارد.

۳۷ درجه سانتی گراد و در زمان های مختلف در طول موج ۳۶۰ نانومتر با استفاده از DTT (که نقش احیای باندهای دی سولفیدی به سولفیدریل در پروتئین را دارد) بررسی گردید. ارزیابی تجمع پروتئین در نمودار شماره ۶، بخش (الف): در حضور آلامکتین (۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و در بخش (ب): در حضور ایورمکتین با غلظت های مشابه آلامکتین جهت مقایسه میزان تجمع نشان داده شده است. نمونه های مورد بررسی توسط بافر فسفات (۲۰

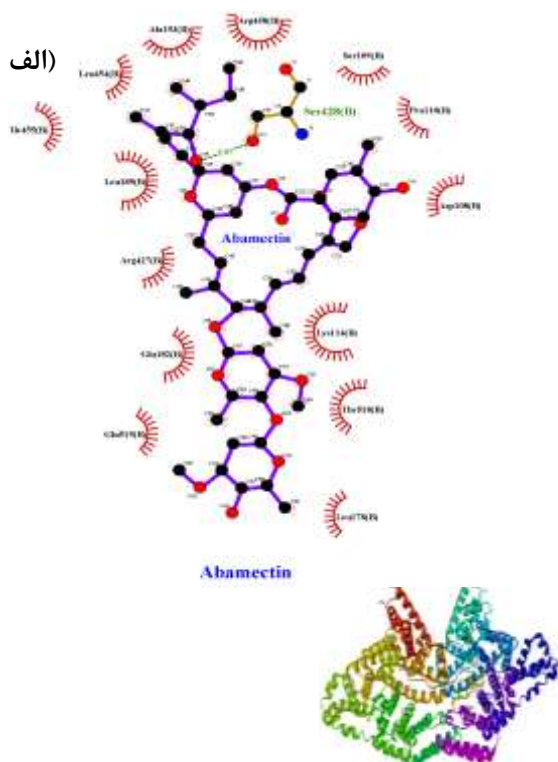
۷-۳- سنجش داکینگ مولکولی (Molecular Docking)

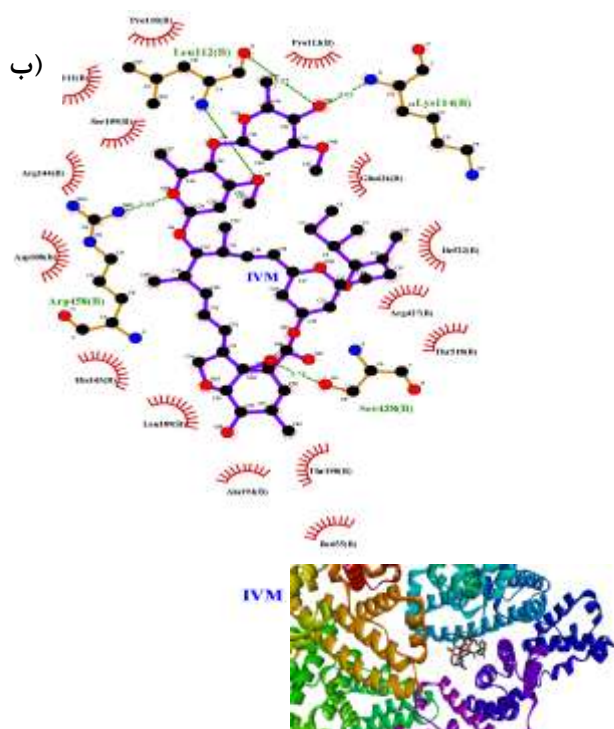
بررسی پیوند لیگاندها و پروتئین ها یک تکنیک علمی است که در کاربردهای داروسازی مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین، برهم کنش مولکولی پروتئین BSA با آلامکتین و پروتئین BSA با ایورمکتین به صورت جداگانه و با استفاده از شبیه سازی مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲ (الف) تشکیل پیوند مولکولی پروتئین-آلامکتین و ۲ (ب) پروتئین-ایورمکتین با استفاده از سیستم خوشه بندی تأیید شده اند و بهترین حالت پیوند لیگاند-پروتئین انتخاب گردید. براساس این داده ها، عوامل انرژی پیوند (قدرت پیوند لیگاند-پروتئین) و اندازه پیوند در انتخاب بهترین خوشه در نظر گرفته شده اند؛ این عوامل نشان دهنده فرکانس و احتمال اتصال لیگاند به سایت های پیوند پروتئین هستند. نتایج تحلیل پیوند مولکولی پروتئین-آلامکتین در شکل ۲ (الف) نشان می دهند که انرژی پیوند در شش خوشه به ترتیب ۱۱/۹، -۱۰/۶،

نتایج تحلیل پیوند مولکولی پروتئین-ایورمکتین در شکل ۲ (ب) نشان می‌دهند که انرژی پیوند در نه خوشه به‌ترتیب برابر با ۱۱/۰، ۱۰/۰، ۹/۸، ۸/۹، ۸/۸، ۸/۶، ۸/۵، ۸/۳، ۸/۰ کیلوکالری بر مول است. این نتایج نشان می‌دهند که ایورمکتین به‌طور خودبه‌خودی و پایدار به پروتئین در بهترین حالت (۱۱/۰-کیلوکالری بر مول) متصل شده است و این حالت برای تحلیل بیشتر و بررسی برهم‌کنش مولکولی انتخاب گردید. برهم‌کنش پیوند مولکولی پروتئین-ایورمکتین با استفاده از نرم‌افزار ligplot تحلیل شد. این انرژی پایین نشان‌دهنده اتصال قوی بین پروتئین و ایورمکتین است. براساس برهم‌کنش‌ها و موقعیت‌های مشاهده‌شده در شکل ۲ (ب)، ایورمکتین در نواحی زیر دامنه‌های IIA و IIIA از BSA متصل می‌شود. این نواحی در BSA معمولاً به‌عنوان محل‌های اتصال لیگاندها شناخته می‌شوند و اغلب لیگاندها به این زیردامنه‌ها اتصال می‌یابند. همچنین چندین پیوند هیدروژنی مهم بین ایورمکتین و BSA وجود دارد که به

پایداری بیشتر سیستم کمک می‌کنند از جمله: Leu112(B) با فاصله ۳/۲۲ Å، Lys114(B) با فاصله ۳/۰۲ Å، Arg458(B) با فاصله ۳/۰۳ Å می‌باشد. این پیوندهای هیدروژنی نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های قوی و نقش اساسی باقی‌مانده‌های آمینواسیدی در تشکیل سیستم پایدار هستند. علاوه بر این، ایورمکتین برهم‌کنش‌های آب‌گریزی با باقی‌مانده‌های آمینواسیدی از قبیل:

Arg144(B)، His145(B)، Leu189(B)، Ile522(B)، Thr518(B)، Ala193(B)، Ile455(B) می‌باشد. این برهم‌کنش‌ها نقش مهمی در حفظ پایداری سیستم ایفا می‌کنند. نتایج داکینگ مولکولی نشان می‌دهند که انرژی اتصال آبامکتین به پروتئین BSA برابر ۱۱/۹- کیلوکالری بر مول است، درحالی‌که انرژی اتصال ایورمکتین به پروتئین BSA کمتر و برابر ۱۱/۰- کیلوکالری بر مول می‌باشد. این تفاوت نشان می‌دهد که آبامکتین با قدرت اتصال بیشتری نسبت به ایورمکتین به پروتئین متصل می‌شود.





شکل ۲- بررسی اتصال مولکولی و نمایش یک نمودار دوتبعی از باقی‌مانده‌های آمینواسیدی BSA درگیر در برهم‌کنش با لیگاندها را نشان می‌دهد؛ (الف) پیوند مولکولی پروتئین-آبامکتین (ب) پیوند مولکولی پروتئین-ایورمکتین در این تصاویر خط‌چین سبز نشان‌دهنده پیوند هیدروژنی و کمان قرمز نشان‌دهنده برهم‌کنش هیدروفوب است.

۴- بحث

نسبت داده می‌شود (25). به‌طور مقایسه‌ای، شیب تغییرهای بیشینه جذب در غلظت‌های مختلف آبامکتین (۱۰/۷۹) نسبت به ایورمکتین (۶/۷۸-) شدیدتر است. مقادیر منفی انرژی آزاد اتصال (ΔG) در هر دو برهم‌کنش پروتئین-آبامکتین و پروتئین-ایورمکتین تأیید می‌کند که این برهم‌کنش‌ها به‌صورت خودبه‌خودی رخ می‌دهند. مقایسه انرژی اتصال آبامکتین به پروتئین (۱۱/۹- کیلوکالری بر مول) با انرژی اتصال ایورمکتین به پروتئین (۱۱/۰- کیلوکالری بر مول) نشان می‌دهد که آبامکتین با قدرت اتصال بیشتری به پروتئین متصل می‌شود. همچنین، طبق نتایج اتصال مولکولی براساس نرم‌افزار ligplot، آبامکتین از طریق برهم‌کنش‌های هیدروفوبی و الکتروستاتیک به پروتئین BSA متصل می‌شود که این نوع اتصال مربوط به گروه‌های عاملی موجود در ساختار شیمیایی آن است. آبامکتین فاقد یکی از گروه‌های هیدروکسیل جانبی موجود در ایورمکتین است که این تفاوت منجر به افزایش آب‌گریزی آن می‌شود و تمایل بیشتری برای اتصال به بخش‌های هیدروفوب و برهم‌کنش‌های هیدروفوبی بیشتر دارد. همان‌طور که در شکل

استفاده گسترده از سموم کشاورزی از جمله آفت‌کش‌ها، منجر به نفوذ این ترکیب‌ها در جریان خون انسان و برهم‌کنش آن‌ها با پروتئین‌های پلاسما، مانند پروتئین آلبومین سرم انسانی می‌شوند؛ این برهم‌کنش‌ها می‌توانند عملکرد زیستی پروتئین‌ها را تحت‌تأثیر قرار دهند. این مطالعه، برهم‌کنش آلبومین سرم گاوی (BSA) با آفت‌کش آبامکتین و داروی ایورمکتین که هر دو از خانواده آورمکتین‌ها هستند، با استفاده از تکنیک‌های مختلف طیف‌سنجی و مدل‌سازی مولکولی بررسی گردید. نتایج حاصل از طیف‌سنجی و مدل‌سازی مولکولی نشان دادند که این ترکیب‌ها می‌توانند تغییرهای ساختاری در BSA ایجاد کنند. نتایج طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی نشان داد که افزایش غلظت لیگاندها (آبامکتین و ایورمکتین) باعث کاهش شدت جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر می‌شود. این تغییرها نشان‌دهنده برهم‌کنش میان لیگاندها و پروتئین BSA است. کاهش شدت جذب (هیپوکرومیک) به انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ در اسیدآمین‌های آروماتیک تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین

گرفت. نتایج حاصل از طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی و بررسی اثر اوره با روش طیف‌سنجی فلورسانس نشان دادند هر دو لیگاند موجب تغییر در ساختار پروتئین BSA شدند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل طیف‌های ATR-FTIR نشان داد که تغییرهای جزئی در محتوای ساختار دوم پروتئین رخ داده است. نتایج داکینگ مولکولی نشان دادند که آتامکتین برهم‌کنش قوی‌تری با BSA دارد. این میل ترکیبی بیشتر، به تفاوت‌های ساختار شیمیایی، گروه‌های عاملی و نوع برهم‌کنش این ترکیب‌ها با پروتئین مرتبط است. آزمایش تجمع حرارتی نشان داد که میزان تجمع پروتئین در حضور آتامکتین بیشتر از ایورمکتین است. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان دادند که برهم‌کنش آتامکتین و ایورمکتین با BSA به‌صورت خودبه‌خودی انجام می‌شود و منجر به تغییرهای ساختاری در پروتئین می‌گردد. همچنین اثرهای مولکولی آتامکتین در برهم‌کنش با پروتئین نسبت به ایورمکتین بیشتر است که می‌تواند در بررسی‌های آتی درباره تأثیرهای زیستی این ترکیب‌ها مورد توجه قرار گیرد.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی وجود ندارد.

۸- سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند. نویسنده مسئول (پروانه مقامی) هماهنگی ارسال مقاله و ارتباط با مجله را برعهده داشته است. تمامی نویسندگان متن نهایی مقاله را مطالعه و تأیید نموده‌اند و مسئولیت علمی آن را می‌پذیرند.

۲ مشاهده می‌شود آتامکتین با یک پیوند هیدروژنی Ser (428B) و چندین برهم‌کنش هیدروفوبیک به پروتئین متصل شده است، درحالی‌که ایورمکتین با تعداد بیشتری از پیوندهای هیدروژنی به پروتئین متصل شده و ترکیبی از برهم‌کنش‌های قطبی و غیرقطبی را نشان می‌دهد. مطالعات پیشین نیز برهم‌کنش اتصال BSA و داروی روفلومیلاست با استفاده از روش‌های مختلف در سطح ساختاری مولکولی بررسی کردند. داده‌های طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی نشان داد که برهم‌کنش بین BSA و روفلومیلاست باعث تغییراتی در ساختار BSA می‌شود و نتایج ترمودینامیکی نیز تأیید کرد که این برهم‌کنش خودبه‌خودی بوده و برهم‌کنش آبگریز بین آن‌ها رخ داده است. این یافته‌ها با نتایج طیف‌سنجی UV-Vis و بررسی‌های حاضر در این مطالعه هم‌راستا هستند (26). بررسی اثر اوره با روش طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که روند تغییرها شدت بیشینه نشر در حضور آتامکتین و ایورمکتین کاهش می‌یابد، اما روند تغییرهای کاهش در حضور آتامکتین بیشتر از ایورمکتین است. علاوه بر این، جابه‌جایی عدد موج در طیف‌های ATR-FTIR در ناحیه $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ مشاهده نشد؛ بنابراین تغییر قابل توجهی در ساختار دوم پروتئین در برهم‌کنش آتامکتین و ایورمکتین رخ نداده است و تغییرهای جذب در طیف‌ها نشان‌دهنده تغییرهای جزئی در محتوای ساختار دوم می‌باشد (27). همچنین، در بررسی تجمع حرارتی پروتئین در حضور هر دو لیگاند افزایش جذب مشاهده شد؛ اما شیب تغییرها در حضور آتامکتین از ایورمکتین بیشتر بود که نشان‌دهنده اثر تجمعی بیشتر پروتئین در حضور آتامکتین است. مطالعه‌های پیشین برهم‌کنش بین آلبومین سرم انسان و حشره‌کش ایمیداکلوپید در سطح مولکولی مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق، مشابه مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های مختلف طیف‌سنجی برهم‌کنش آلبومین سرم انسان و ایمیداکلوپید بررسی شد و تغییرهای ساختار پروتئین در برهم‌کنش با ایمیداکلوپید تأیید گردید (14).

۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثرهای زیستی آفت‌کش آتامکتین و داروی ایورمکتین با پروتئین مدل BSA مورد بررسی قرار

۹- منابع

- 1.Fattahi E, Parivar K, Jorsaraei SGA, Moghadamnia AA. The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. *Iran J Reprod Med*. 2009;7(2):59-64.
- 2.Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: A review. *Med Sci Monit*. 2004;10(6).
- 3.Taylor MD, Klaine SJ, Carvalho FP, Barcelo D, Everaarts J, editors. *Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems* [Internet]. CRC Press; 2002. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781134554300>
- 4.Kragh-Hansen U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* [Internet]. 1990 Feb;37(1):57-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155760>
- 5.Aminiahidashti H, Jamali SR, Gorji AMH. Conservative care in successful treatment of abamectin poisoning. *Toxicol Int*. 2014;21(3):322-4.
- 6.Sung YF, Huang CT, Fan CK, Lin CH, Lin SP. Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy. *Clin Toxicol*. 2009;47(7):686-8.
- 7.Batiha GES, Alqahtani A, Ilesanmi OB, Saati AA, El-Mleeh A, Hetta HF, et al. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. *Pharmaceuticals*. 2020;13(8):1-37.
- 8.S Khalil M. Abamectin and Azadirachtin as Eco-friendly Promising Biorational Tools in Integrated Nematodes Management Programs. *J Plant Pathol Microbiol* [Internet]. 2013;04(04). Available from: <https://www.omicsonline.org/abamectin-and-azadirachtin-as-eco-friendly-promising-biorational-tools-in-integrated-nematodes-management-programs-2157-7471.1000174.php?aid=14020>
- 9.Pitterna T, Cassayre J, Hüter OF, Jung PMJ, Maienfisch P, Kessabi FM, et al. New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2009 Jun;17(12):4085-95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089609000030>
- 10.Chen IS, Kubo Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *J Physiol*. 2018;596(10):1833-45.
- 11.Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol* [Internet]. 2017;33(6):463-72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>
- 12.Popp M, Kranke P, Meybohm P, Metzendorf MI, Skoetz N, Stegemann MS, et al. Evidence on the efficacy of ivermectin for COVID-19: another story of apples and oranges. *BMJ evidence-based Med*. 2022;27(3):187-8.
- 13.Alka, Gopal R., Sandhu K., Sidhu P. Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Vet Parasitol* [Internet]. 2004 May;121(3-4):277-83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704001219>
- 14.Wang Y qing, Tang B ping, Zhang H mei, Zhou Q hua, Zhang G cheng. Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: Spectroscopic approach. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2009 Mar;94(3):183-90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134408002352>
- 15.Hadichegeni S, Goliaei B, Taghizadeh M, Davoodmanesh S, Taghavi F, Hashemi M. Characterization of the interaction between human serum albumin and diazinon via spectroscopic and molecular docking methods. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2018 Sep 4;37(9):959-71. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327117741752>
- 16.Hadi Chegini S, Taghizadeh B, Goliaei B. The Effect of Pesticides on the Structural Changes of Human Serum Albumin Protein: A Systematic Review. *J Arak Univ Med Sci* [Internet]. 2019 Aug 30;136-69. Available from: <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-6080-en.html>
- 17.Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Feb 27;15(3):3580-95. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/3/3580>
- 18.Siddiqui S, Ameen F, ur Rehman S, Sarwar T, Tabish M. Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin. *J Mol Liq* [Internet]. 2021 Aug;336:116200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732221009272>
- 19.Gelamo EL, Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2000 Oct;56(11):2255-71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142500003139>
- 20.Ketrat S, Japrun D, Pongprayoon P. Journal of Molecular Graphics and Modelling Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2020;98:107601. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107601>
- 21.Huang BX, Kim HY, Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004;15(8):1237-47.
- 22.Wang Q, Huang C ren, Jiang M, Zhu Y yao, Wang J, Chen J, et al. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2016 Mar;156:155-63. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142515303280>

23. Afrin S, Rahman Y, Tabish M. Elucidating the interaction of ticlopidine with serum albumin and its role in bilirubin displacement in vitro. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2019 Mar 4;37(4):863–76. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2018.1449667>

24. Makhatadze GI. Thermodynamics of Protein Interactions with Urea and Guanidinium Hydrochloride. *J Phys Chem B* [Internet]. 1999 Jun 1;103(23):4781–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp990413q>

25. Ameen F, Siddiqui S, Jahan I, Nayeem SM, Rehman S ur, Tabish M. A detailed insight into the interaction of memantine with bovine serum albumin: A spectroscopic and computational approach. *J Mol Liq* [Internet]. 2020 Apr;303:112671. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732219363263>

26. Wani TA, Bakheit AH, Ansari MN, Al-Majed AR, AlQahtani BM, Zargar S. Spectroscopic and molecular modeling studies of binding interaction between bovine serum albumin and roflumilast. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2018 Aug;Volume 12:2627–34. Available from: <https://www.dovepress.com/spectroscopic-and-molecular-modeling-studies-of-binding-interaction-be-peer-reviewed-article-DDDT>

27. Siddiqui S, Ameen F, Jahan I, Nayeem SM, Tabish M. A comprehensive spectroscopic and computational investigation on the binding of the anti-asthmatic drug triamcinolone with serum albumin. *New J Chem* [Internet]. 2019;43(10):4137–51. Available from: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C8NJ05486J>